

Sulfonamidderivate polycyclischer Farbstoffe für analytische Anwendungen

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Herstellung von Sulfonsäuregruppen-haltigen Chinolinverbindungen, die Chinolinverbindungen selbst sowie deren Umsetzung zu Sulfonsäuregruppen-enthaltenden Farbstoffen. Die erfindungsgemäßen
10 Farbstoffe finden insbesondere Anwendung zur Markierung von Analyten, beispielsweise zur Markierung von Biomolekülen.

Farbstoffe aus der Klasse der Cumarin-, der Xanthen-, der Oxazinfarbstoffe sowie verwandte Derivate werden aufgrund ihrer sehr guten spektralen
15 Eigenschaften, insbesondere ihrer Fluoreszenz, bevorzugt in der chemischen, biologischen und medizinischen Analytik als Markierungsgruppen eingesetzt (J. Slavik, Fluorescent Probes in Cellular and Molecular Biology, CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 1994). Eine große Anzahl von langwelligen Xanthen-Farbstoffen (Rhodamine
20 etc.) werden beschrieben in EP 0567622 B1. Markierungsfarbstoffe aus der Klasse der Oxazine werden offenbart in EP 0747447 B1. Sulfonsäurederivate von Xanthen-Farbstoffen sind beschrieben in WO 99/15517. Farbstoffe aus den Klassen der Carbopyronine und Amidopyrylium-Farbstoffe werden beschrieben in WO 00/64986 und WO 00/64987. Dabei spielen vor allem
25 Farbstoffe mit einer hohen Fluoreszenzquantenausbeute eine wichtige Rolle, da über die Fluoreszenz ein sehr empfindlicher Nachweis des markierten Analyten möglich ist. Aber auch nicht-fluoreszierende Derivate gewinnen zunehmend als Quencher in speziellen Verfahren Bedeutung.

30 Zur Verwendung als Markierungsgruppen für Analyte ist neben einer einfachen und zuverlässigen Nachweisbarkeit eine gute Löslichkeit, z.B. in wässrigen Systemen, erforderlich. In anderen Fällen ist, gerade umgekehrt,

- 2 -

gute Löslichkeit in unpolarer Umgebung, z.B. Zellmembranen, erwünscht.

Von entscheidender Bedeutung für die Anwendbarkeit als Markierungsgruppen für Analyte oder in ähnlichen Verfahren sind also je nach den konkreten Bedingungen bestimmte spezifische Eigenschaften, über die der Fluorophor zusätzlich zu seinen optischen Eigenschaften verfügen sollte. Diese sind bei den Farbstoffen der genannten Patente entweder gar nicht oder, wenn überhaupt, nur sehr umständlich durch Farbstoffsynthese unter Verwendung entsprechender Edukte zu erreichen.

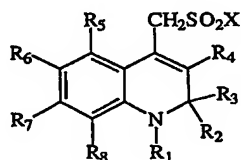
10

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung bestand deshalb darin, bestimmte physikalische und/oder chemische Eigenschaften – etwa die Löslichkeit in bestimmten Medien, die Tendenz zu unspezifischen Wechselwirkungen mit Substraten und/oder Gefäßwänden oder Kopplungsfähigkeit – dieser Farbstoffe in einfacher Weise – auch nachträglich – zu modifizieren, ohne die sehr guten spektralen Eigenschaften der Farbstoffe wesentlich zu verändern.

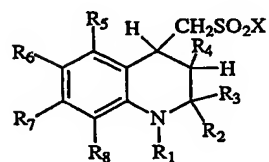
15

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch die Darstellung von Verbindungen der allgemeinen Formeln I a und I b

20



I a



I b

Sowie ihre Verwendung zur Darstellung von Farbstoffen, die z.B. als Markierungsgruppen in einem Verfahren zum Nachweis von Analyten eingesetzt werden können, wobei

- 3 -

R₁ Wasserstoff oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen, z.B. Polyether, Phenyl, Phenylalkyl mit 1-3 C-Atomen in der Kette bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen gegebenenfalls Heteroatome, wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome, oder/und einen oder mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können,

R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ und R₈ jeweils unabhängig Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo- oder Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine gesättigte oder ungesättigte, geradkettige, verzweigte oder cyclische Kohlenwasserstoffgruppe mit bis zu 20 C-Atomen bedeuten, wobei die Kohlenwasserstoffgruppen Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl, insbesondere Phenyl-, oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls auch Heteroatome, wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome, oder/und mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Phospho-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können, oder der Rest R₈ mit R₁ ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann, und

X Halogen, eine Hydroxy-, Alkoxy-, Alkylthio- oder Aminogruppe bedeuten, wobei die gegebenenfalls vorhandenen Kohlenwasserstoffreste dieser Gruppen insbesondere Alkyl-, Alkenyl-, Alkynyl-, Cycloalkyl-, Aryl, insbesondere Phenyl-, oder/und Heteroarylreste umfassen und gegebenenfalls auch Heteroatome, wie Sauerstoff-, Schwefel- oder Stickstoffatome, oder/und mehrere Substituenten, vorzugsweise ausgewählt aus Halogenen, Hydroxy-, Amino-, Phospho-, Sulfo-, Carboxy-, Carbonyl-, Alkoxy- oder/und Alkoxycarbonylgruppen, enthalten können.

30

Bei bevorzugten Ausführungsformen bedeutet R₁ einen Aryl- oder Alkylrest, R₂ und R₃ jeweils Methyl und R₄ Wasserstoff.

- 4 -

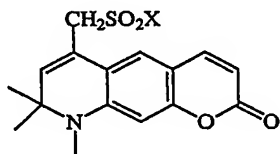
In weiteren besonders bevorzugten Formen bedeutet R_1 einen Aryl- oder Alkylrest, R_2 und R_3 jeweils Methyl, R_4 Wasserstoff und R_7 eine Hydroxy- oder Methoxygruppe.

5

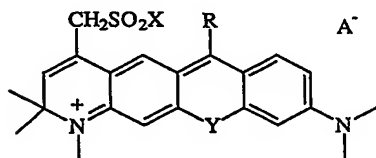
In noch weiteren besonders bevorzugten Formen bedeutet R_1 einen Aryl- oder Alkylrest, R_2 und R_3 jeweils Methyl, R_4 Wasserstoff und R_6 eine Nitroso-, Formyl- oder eine Hydroxymethylgruppe.

- 10 In einer weiteren besonders bevorzugten Verbindungsklasse sind R_1 mit R_8 verbrückt und bilden ein Ringsystem, insbesondere einen 5- oder 6-gliedrigen Ring.

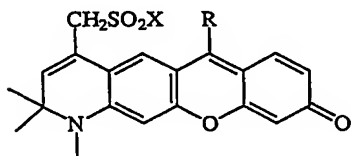
Die vorzugsweise verwendeten bzw. dargestellten Farbstoffe sind Vertreter
 15 der nachfolgend zusammengestellten Klassen - aber nicht auf diese Klassen beschränkt - der allgemeinen Formeln II - VII. Bei Farbstoffen der Klassen III und V - VII, die über ein symmetrisches chromophores System verfügen, ist es erfindungsgemäß durch Wahl der Edukte möglich, zwei - gleiche oder verschiedene - SO_2X -Gruppen einzuführen. Durch nachträgliche Hydrierung
 20 ist es in gleicher Weise wie bei den Edukten I möglich, entsprechende Farbstoffe mit Tetrahydrochinolin-Endgruppen herzustellen.



II Coumarine

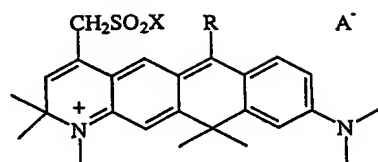


III Xanthenfarbstoffe
 $Y = \text{O}, \text{S}, \text{Se}$

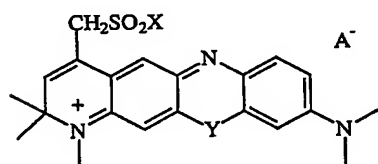


IV Rhodol-Farbstoffe

- 5 -

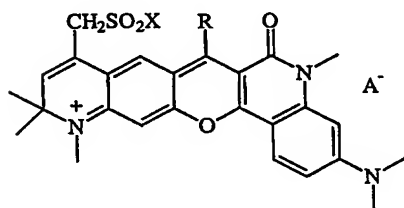


V Carbopyronine



VI Azin-Farbstoffe

Y = O (Oxazine), S
(Thiazine), CR₂ (Carbazine)



VII Amidopyryliumfarbstoffe

wobei R insbesondere = H, (subst.) Aryl, (subst.) Carboxyphenyl, (subst.) Alkyl, (subst.) Cycloalkyl, (subst.) Pyridyl, (subst.) Carboxypyridyl etc.

- 25 Erfindungsgemäß können entweder entsprechende Synthesestufen oder die eigentlichen Farbstoffe sulfoniert und anschließend die Sulfonsäuregruppe(n) derivatisiert werden. Dazu wird die Sulfonsäure oder ihr Salz bevorzugt in ein Sulfochlorid überführt und dieses anschließend mit einem Nucleophil (z.B. Amino- oder Mercaptogruppe) umgesetzt. Die
- 30 Sulfonierung gelingt z.B. in konzentrierter Schwefelsäure, gegebenenfalls im Gemisch mit Oleum. Die Sulfonsäurederivate sowohl der Vorstufen als auch der Farbstoffe lassen sich in einfacher Weise mit Phosphoroxychlorid, Phosphorpentachlorid oder Thionylchlorid bevorzugt im Gemisch mit Dimethylformamid zum Sulfochlorid umsetzen. Überraschenderweise können
- 35 die Sulfochloride in fast allen Fällen problemlos isoliert werden. Die Sulfochloride reagieren mit verschiedenen Nucleophilen, vorzugsweise mit primären oder sekundären Aminen, zu entsprechenden Sulfonamid-Derivaten. Die physikalischen und/oder chemischen Eigenschaften der so erhaltenen Verbindungen hängen dabei auch ganz entscheidend von der
- 40 Natur des eingesetzten Amins ab, wie später noch ausführlicher – auch anhand von Beispielen – erläutert wird. Dabei wird eine erstaunlich große Vielfalt von pH-stabilen Sulfonamid-Derivaten erhalten. Die

- 6 -

erfindungsmäßige Art der Sulfonamid-Verknüpfung sorgt für eine räumliche Separation von Substituent und Chromophor und verhindert dadurch einen nachteiligen Einfluss auf die Fluoreszenz-Effizienz. Die Farbstoffsulfochloride können auch – ohne vorherige Derivatisierung – direkt zur Kopplung an
5 nucleophile (NH_2 etc. Gruppen) Gruppen von Analytmolekülen verwendet werden.

Der Begriff Heteroatome, wie hierin verwendet, umfasst insbesondere Sauerstoff-, Schwefel- und Stickstoffatome.

10 Der Begriff Substituenten umfasst, soweit nicht anders angegeben, insbesondere Halogen, Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Phospho-, Carboxy-, Alkoxy- sowie Alkoxy-carbonylgruppen mit, soweit vorhanden, 1-10 C-Atomen.

15 Zur Darstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen werden folgende allgemeine Verfahren angewendet. Es können entweder die Vorstufen (Punkt 1) oder die fertigen Farbstoffe (Punkt 2) derivatisiert werden.

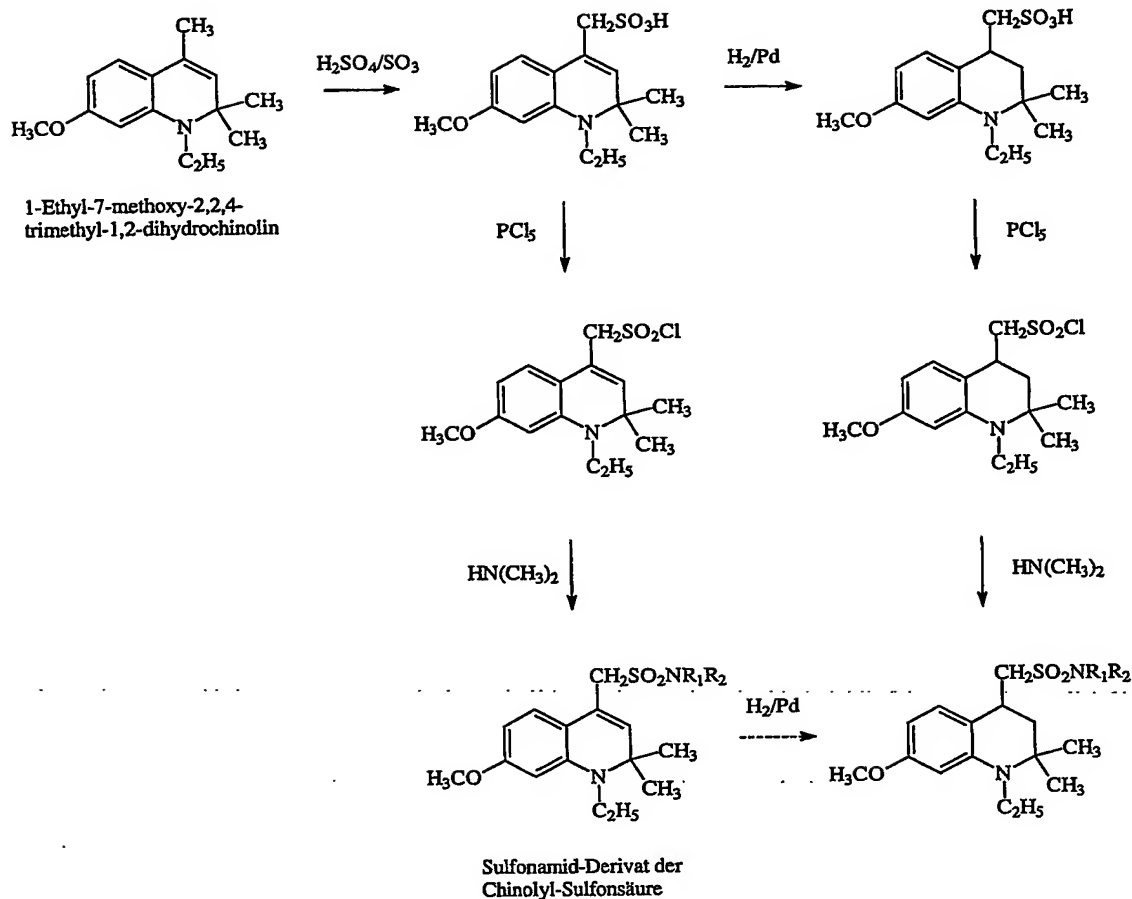
1. Synthese entsprechender Vorstufen

20

Ausgehend von einem nach literaturbekannten Methoden, z.B. durch die Kondensation eines Anilinderivats mit Mesityloxid und anschließende N-Alkylierung, dargestellten 7-Alkoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin wird erfindungsgemäß folgendermaßen vorgegangen:

25

- 7 -

**Abbildung 1:**

- Beispielhafte Darstellung erfindungsgemäßer Verbindungen. Es wird
- 5 ausgehend von 1-Ethyl-7-methoxy-2,2,4-trimethyl-1,2-dihydrochinolin über die Zwischenstufen der Sulfonsäure und des Sulfochlorids schließlich ein Sulfonamid-Derivat erhalten. Durch intermediäre Hydrierung lässt sich das entsprechende 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin-Derivat erhalten.
- 10 Durch Verrühren des Dihydrochinolins mit einem Gemisch aus konzentrierter Schwefelsäure und Oleum bei Raumtemperatur erhält man ein an der 4-Methylgruppe sulfoniertes Produkt. Diese Sulfonsäure oder ihr Salz kann leicht in das Sulfochlorid überführt werden. Dazu wird die sulfonierte Verbindung bevorzugt bei Raumtemperatur in Benzol mit
- 15 Phosphorpentachlorid umgesetzt. Allgemein verwendet man für die Darstellung des Sulfochlorids gebräuchliche Reagenzien wie

- 8 -

Phosphoroxychlorid, Phosphorpentachlorid oder Thionylchlorid. Die Reaktion wird in einem wasserfreien inerten Lösungsmittel, vorzugsweise Benzol, ausgeführt.

- 5 Das Sulfochlorid kann durch einfache Umsetzung mit fast beliebigen primären und sekundären Aminen in ein entsprechendes Sulfonamid überführt werden. Umsetzungen des Sulfochlorids mit anderen Nucleophilen (Thiole, Alkohole etc.) sind ebenfalls möglich. Gegebenenfalls kann das erhaltene stabile Sulfonamid weiter derivatisiert werden (Verseifung von
- 10 Carbonestergruppen o.ä.).

Das 1,2-Dihydrochinolin lässt sich z.B. auf der Stufe der Sulfonsäure palladiumkatalysiert mit Wasserstoff hydrieren und so in ein 1,2,3,4-Tetrahydrochinolin überführen. Dieses hydrierte Chinolin kann anschließend

15 dem gleichen Syntheseweg unterworfen werden (siehe Abbildung 1).

Mit den so erhaltenen Sulfonsäuren, ihren Salzen oder bevorzugt den Sulfonamid-Derivaten werden die nachfolgenden Farbstoffsynthesen nach den dem Fachmann bekannten Darstellungsmethoden durchgeführt:

20

Symmetrische Rhodaminfarbstoffe lassen sich z.B. durch die Kondensation des beschriebenen Sulfonamid-Derivats mit Phthalsäureanhydrid erhalten. Andere Xanthenfarbstoffe, wie z.B. Trifluormethyl-, Pyronin- oder Rosaminfarbstoffe, erhält man durch Kondensation mit den entsprechenden

25 Säureanhydriden (Trifluoressigsäureanhydrid) oder Aldehyden (Benzaldehyd etc.).

Unsymmetrische Farbstoffe erhält man im Falle der Rhodamine z.B. durch die Umsetzung von Phthalsäureanhydrid mit einem Aminophenol oder

30 hydriertem 7-Hydroxy- bzw. 7-Methoxychinolin und die anschließende Umsetzung des gebildeten Benzophenon-Derivats, z.B. mit einem zweiten Dihydro- oder Tetrahydrochinolin, wobei jetzt etwa ein erfindungsgemäßes

Sulfonamid-Derivat zum Einsatz kommen kann.

Die Vertreter anderer Farbstoffklassen, wie z.B. Cumarine, Carbopyronine, Amidopyryliumfarbstoffe, Oxazine usw., lassen sich mit den Sulfonsäuren, ihren Salzen oder den Sulfonamid-Derivaten der erwähnten oder ähnlicher Chinolinvorstufen nach literaturbekannten Methoden herstellen. Das heißt, in den bekannten Syntheseverfahren können die erfindungsgemäßen Verbindungen überraschenderweise problemlos für die Darstellung der Farbstoffe eingesetzt werden.

10

2. Nachträgliche Derivatisierung der Farbstoffe

Erfindungsgemäß können Farbstoffe nachträglich an der 4-Methylgruppe sulfoniert werden. Ein ähnliches Verfahren ist in der Patentanmeldung WO 99/15517 für Xanthenfarbstoffe beschrieben. Überraschenderweise gelingt eine solche nachträgliche Sulfonierung auch bei vielen anderen polycyclischen Farbstoffen. Dadurch vereinfacht sich die Synthese der erfindungsgemäßen Sulfonamidderivate beträchtlich.

Die so erhaltenen sulfonierten Farbstoffe sind erstaunlicherweise ebenfalls – wie oben im Falle der Edukte beschrieben – in Sulfochloride überführbar, ohne dass der Chromophor dabei verändert oder zerstört wird. Hier wird neben Phosphoroxychlorid und/oder Phosphorpentachlorid bevorzugt eine Mischung aus Thionylchlorid und Dimethylformamid verwendet. Die Sulfochloride können als Perchlorate isoliert und gereinigt werden. Die isolierten Farbstoffsulfochloride lassen sich in bekannter Weise direkt als Marker für Aminogruppen in Biomolekülen einsetzen. Die so gewonnenen Sulfochloride können aber auch – wie oben für die Chinolin-Vorstufen beschrieben – mit fast beliebigen primären und sekundären Aminen umgesetzt werden. Man kann auf diese Weise besonders einfach die erfindungsgemäßen Farbstoffe erhalten.

30

- 10 -

Durch die Einführung der Sulfonsäuregruppe und ihre Derivatisierung werden die spektralen Eigenschaften, wie Absorptions- und Fluoreszenzmaximum, Extinktionskoeffizient sowie die Fluoreszenzquantenausbeute der Farbstoffe, praktisch nicht beeinflusst.

5

Durch das beschriebene Verfahren kann man aber auf einfache Weise oder sogar nachträglich den Farbstoffen – je nach verwendetem primären oder sekundären Amin – eine Vielfalt neuer Eigenschaften vermitteln. Denn das Amin kann fast beliebige weitere funktionelle Gruppen tragen. So lassen sich
10 z.B. Cyano-, Mercapto-, Halogen-, Sulfonsäure-, Hydroxy-, Alkenyl-Gruppen etc. durch unser Verfahren in den Farbstoff einführen.

15

Trägt das verwendete Amin z.B. längere Alkylketten, z.B. C₁₀ bis C₃₀, so erhöht sich der lipophile Charakter, und die Verbindung ist in unpolaren Medien und Membranen löslich und kann so zum Nachweis von Membraneigenschaften oder zu molekularen Abstandsmessungen eingesetzt werden.

20

Die Wasserlöslichkeit eines Farbstoffs lässt sich verbessern, wenn das Amin wiederum Sulfon- oder Phosphonsäuregruppen trägt oder über Polyetherketten verfügt. Letztere machen die Verbindung auch in vielen organischen Lösungsmitteln besser löslich. Auch lassen sich dadurch ungewünschte unspezifische Wechselwirkungen mit Substrat oder Gefäßwänden vermindern. Eine Art cyclischer Polyether stellen die für den
25 fluoreszenzsensitiven Kationennachweis verwendeten Kronenether dar, die als Aza-Derivate auch über die hier beschriebene Methode an Farbstoffmoleküle gekoppelt werden können. Ferner lassen sich nach dem beschriebenen Verfahren auch bichromophore Systeme darstellen, in denen Energieübertragung (FRET) zwischen den Chromophoren stattfindet.

30

Trägt das Amin Substituenten, die zur kovalenten Kopplung fähig sind, z.B. –COOH, –NH₂, –OH oder/und –SH, so kann die erfindungsgemäß hergestellte

- 11 -

Verbindung nach bekannten Methoden an einen Träger und/oder an ein Biomolekül gekoppelt werden. Durch dieses Vorgehen können somit Farbstoffe zur Markierung verwendet werden, die an sich nicht über eine kopplungsfähige Carboxylgruppe o.ä. verfügen, wie es bei den in WO
5 99/15517 beschriebenen Sulfonsäurederivaten noch erforderlich ist. Als Träger kann jedes geeignete Material ausgewählt werden, z.B. poröses Glas, Kunststoffe, Ionenaustauscherharze, Dextrane, Cellulose, Cellulosederivate oder/und hydrophile Polymere. Die Biomoleküle werden vorzugsweise ausgewählt aus Peptiden, Polypeptiden, Nukleotiden, Nukleosiden,
10 Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga oder/und Haptenen.

Eine gängige Methode zur kovalenten Markierung von Biomolekülen ist die dem Fachmann vertraute Aktivestermethode. In einer bevorzugten Weise wird deshalb als Amin eine Carbonsäure mit terminaler Aminogruppe und
15 mittlerer Kettenlänge eingesetzt. So lassen sich z.B. die käufliche 4-Methylaminobuttersäure, 4-Piperidincarbonsäure, 6-Aminohexansäure usw. als Amin in erfindungsgemäßer Weise einsetzen. Man erhält nach der Sulfonamidverknüpfung also Farbstoffe, die über eine koppelbare Carboxylgruppe verfügen. Nach der Ankopplung an primäre Aminogruppen
20 geeigneter Biomoleküle lässt sich die verwendete Markierungsgruppe und damit der Analyt leicht durch ihre Absorption und/oder Fluoreszenz nachweisen.

Die erhaltenen Verbindungen können als Markierungsgruppen und damit der
25 Analyt in Verfahren zur qualitativen oder/und quantitativen Bestimmung eines Analyten verwendet werden. Die Bestimmung kann in wässrigen Flüssigkeiten, z.B. Proben von Körperflüssigkeiten, wie etwa Blut, Serum, Plasma oder Urin, Abwasserproben oder Lebensmitteln, durchgeführt werden. Das Verfahren kann sowohl als Nasstest, z.B. in einer Küvette, oder
30 als Trockentest auf einem entsprechenden Reagenzträger durchgeführt werden. Die Bestimmung der Analyten kann dabei über eine einzige Reaktion oder durch eine Sequenz von Reaktionen erfolgen. Die

- 12 -

Verwendung der erhaltenen Verbindungen zeigt dabei sehr gute Ergebnisse in chemischen und insbesondere in medizinischen und biologischen Nachweisverfahren zur Bestimmung eines Analyten.

- 5 Die Verbindungen können in allen bekannten chemischen, medizinischen und biologischen Nachweisverfahren, in denen Fluoreszenzfarbstoffe als Markierungsgruppen geeignet sind, verwendet werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann bekannt und müssen deshalb nicht weiter ausgeführt werden.

10

- In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die erhaltene Verbindung kovalent an einen für den nachzuweisenden Analyten spezifischen Rezeptor gekoppelt. Der spezifische Rezeptor ist jede geeignete Verbindung oder jedes geeignete Molekül, vorzugsweise ist es ein
15 Peptid, Polypeptid oder eine Nukleinsäure. Die Verbindungen oder Konjugate dieser Verbindungen können beispielsweise in Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren oder immunchemischen Verfahren verwendet werden. Derartige Verfahren sind beispielsweise beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 1989, Cold Spring Harbor.

20

- Ein wesentlicher Vorteil des beschriebenen Verfahrens ist die uneingeschränkte Anwendbarkeit auf alle Farbstoffe, für deren Synthese die oben beschriebenen Di- und Tetrahydrochinoline verwendet werden können. Man ist also in der Lage, durch die Auswahl des Chromophors genau die
25 Farbstoffe auszuwählen, die aufgrund ihrer spektroskopischen Eigenschaften, der Lage der Absorptions- und Fluoreszenzmaxima, der Löslichkeitseigenschaften, der Fluoreszenzabklingzeit und der Höhe der Quantenausbeute für die gewünschte Anwendung besonders geeignet erscheinen.

30

- Die Herstellung von erfindungsgemäßen Verbindungen gelingt nach den vorne beschriebenen Methoden in einfacher und kostengünstiger Weise, wie

- 13 -

in den nachfolgenden Beispielen erläutert wird. Die so hergestellten Verbindungen sind unproblematisch handhabbar und zeigen eine gute Stabilität und Lagerfähigkeit.

- 5 Die Erfindung betrifft somit insbesondere die Herstellung und Verwendung von Dihydrochinolin- und Tetrahydrochinolin-Derivaten entsprechend Formeln Ia und Ib mit $X = OH$ (Sulfonsäuren); $X = Cl, Br, I$ (Sulfonylhalogenide, bevorzugt Chloride); $X = NR_1R_2$ mit R_1 und $R_2 =$ substituierendes Alkyl, Aryl etc. (Sulfonamide); $X = OR$ oder SR mit $R =$ Alkyl, 10 Aryl etc. (Sulfonsäureester, Thiosulfonsäure-S-Ester), sowie die Verwendung von Verbindungen entsprechend Formeln Ia und Ib zur Herstellung polycyclischer Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII.

Die Erfindung umfasst weiterhin die Herstellung und Verwendung 15 polycyclischer Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII durch direkte Einführung von ein oder mehreren Substituenten SO_2X in bekannte Farbstoffe mit Dihydrochinolin- oder Tetrahydrochinolin-Endgruppen, ausgenommen $X = OH$ in Verbindungen entsprechend Formel III mit $Y = O$ und Formel IV.

20

Die Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII werden vorzugsweise zur Markierung von Analyten, insbesondere Biomolekülen (Peptide, Nucleotide etc.), über deren NH_2 - bzw. SH -Gruppen eingesetzt.

- 25 Die Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII mit $X = Cl$ (Sulfonylchlorid) können auch zur Kopplung mit Aminogruppen eines Analyten verwendet werden.

Die Erfindung umfasst weiterhin die Verwendung der Farbstoffe 30 entsprechend Formeln II – VII mit $X = NR_1R_2$ und $R_1 = COOH$ -substituierendes Alkyl oder Aryl zur Bildung von Aktivestern (mit z.B. N-Hydroxysuccinimid) und nachfolgende Kopplung an Aminogruppen eines Analyten. Zudem

können die Farbstoffe entsprechend Formeln II – VII zur Kopplung an freie Aminogruppen anderer Farbstoffe (FRET-Pärchen) verwendet werden.

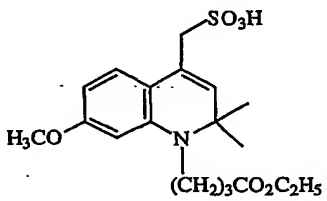
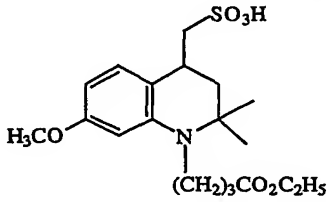
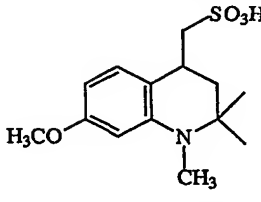
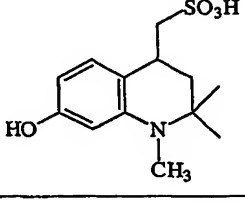
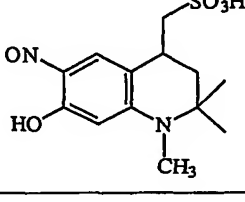
Konkrete Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen sind in den Tabellen

5 1 bis 3 dargestellt.

Tabelle 1:

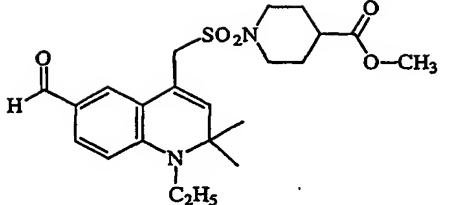
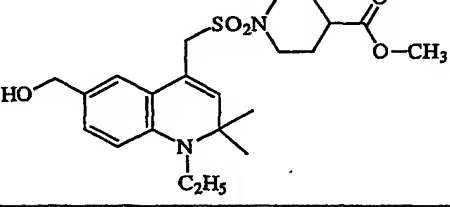
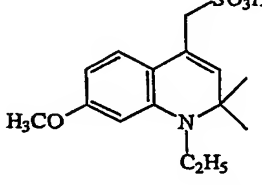
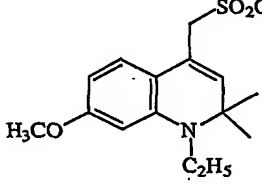
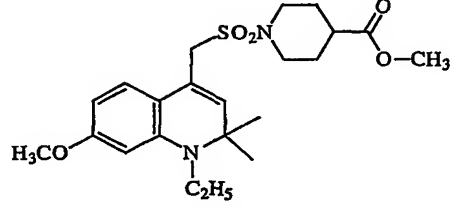
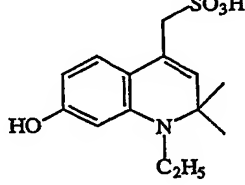
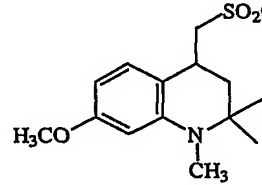
Chinolylsulfonsäuren und deren Derivate

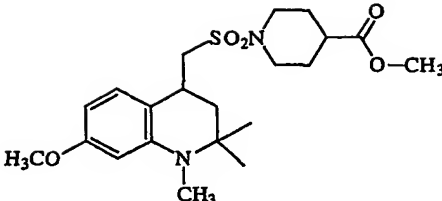
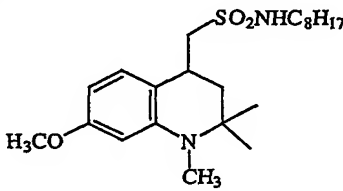
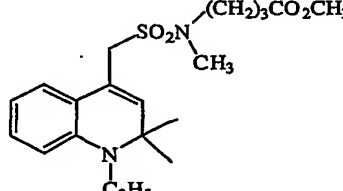
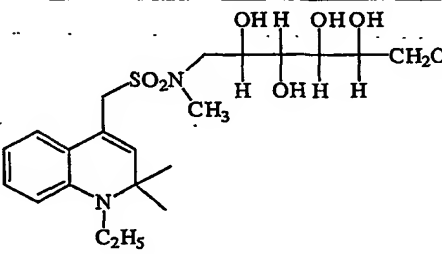
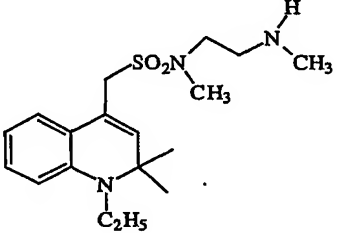
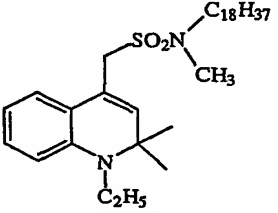
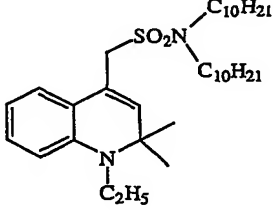
10

Beispiel	Struktur	Summenformel	Masse MH ⁺
1		C ₁₉ H ₂₇ NO ₆ S	398
2		C ₁₉ H ₂₉ NO ₆ S	400
3		C ₁₄ H ₂₁ NO ₄ S	300
4		C ₁₃ H ₁₉ NO ₄ S	286
5		C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O ₅ S	315

6		$C_{17}H_{27}NO_7S_2$	421
7		$C_{13}H_{19}NO_4S$	286
8		$C_{14}H_{19}NO_3S$	284
9		$C_{14}H_{18}ClNO_2S$	302
10		$C_{21}H_{30}N_2O_4S$	407
11		$C_{18}H_{28}N_2O_2S$	337
12		$C_{22}H_{36}N_2O_2S$	393

- 16 -

13		$C_{22}H_{30}N_2O_5S$	435
14		$C_{22}H_{32}N_2O_5S$	437
15		$C_{15}H_{21}NO_4S$	312
16		$C_{15}H_{22}ClNO_3S$	330
17		$C_{22}H_{32}N_2O_5S$	437
18		$C_{14}H_{19}NO_4S$	298
19		$C_{14}H_{20}ClNO_3S$	318

20		$C_{21}H_{32}N_2O_5S$	425
21		$C_{22}H_{38}N_2O_3S$	411
22		$C_{20}H_{30}N_2O_4S$	395
23		$C_{21}H_{34}N_2O_4S$	459
24		$C_{18}H_{29}N_3O_2S$	352
25		$C_{33}H_{58}N_2O_2S$	547
26		$C_{34}H_{60}N_2O_2S$	561

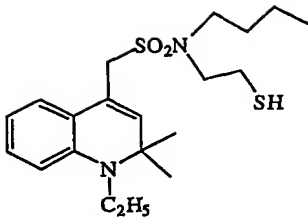
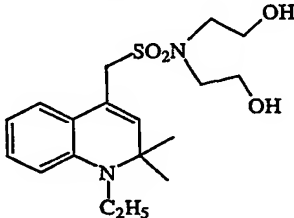
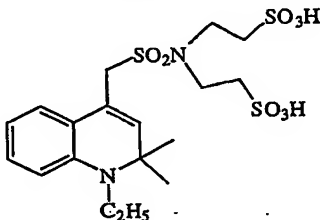
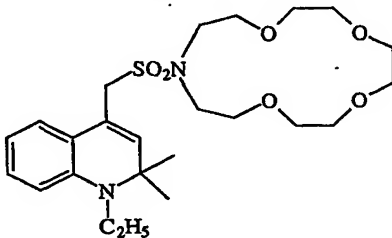
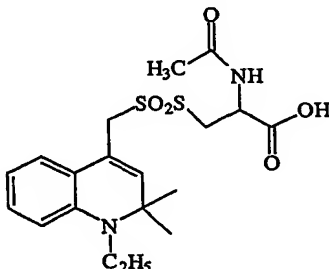
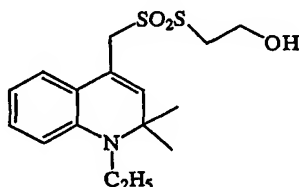
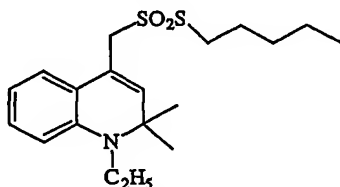
27		$C_{20}H_{32}N_2O_2S_2$	397
28		$C_{18}H_{28}N_2O_4S$	369
29		$C_{18}H_{28}N_2O_8S_3$	497
30		$C_{24}H_{38}N_2O_6S$	483
31		$C_{19}H_{26}N_2O_5S_2$	427
32		$C_{16}H_{23}NO_2S_2$	341
33		$C_{19}H_{29}NO_2S_2$	367

Tabelle 2a:**Cumarinfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe**

Spektrale Daten in Ethanol: λ_a Absorptionsmaximum,
 λ_f Fluoreszenzmaximum

5

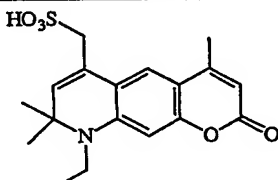
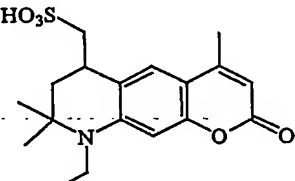
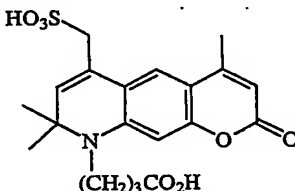
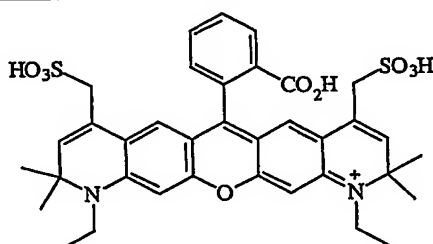
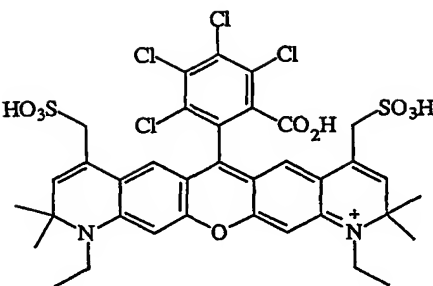
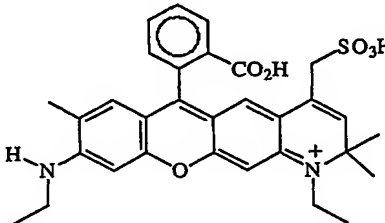
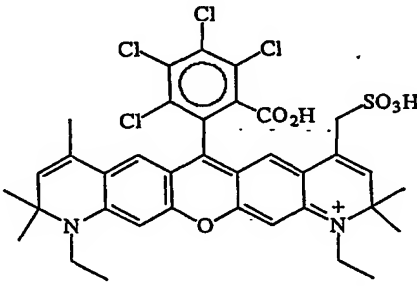
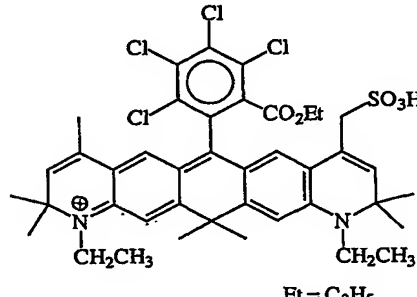
Name	Struktur	λ_a / nm	λ_f / nm
34 AZ 59		394	468
35 AZ 100		383	455
36 AZ 101		394	469

Tabelle 2b:**Rhodaminfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe**

10 Spektrale Daten in Ethanol: λ_a Absorptionsmaximum,
 λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
37 JA 317		592	612

- 20 -

38 JA 325		621	642
39 AZ 58		562	587
40 JA 407		623	645
41 JA 407-E	 <p style="text-align: center;">Et = C₂H₅</p>	623	644

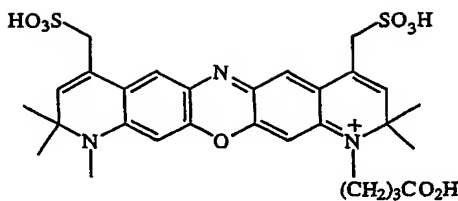
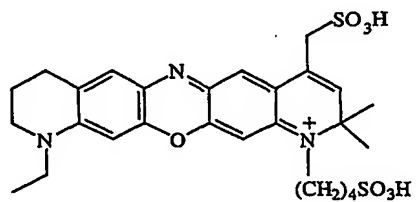
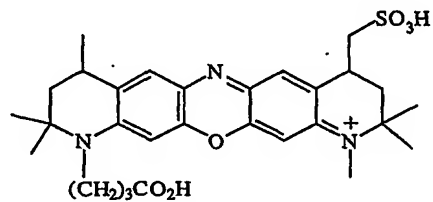
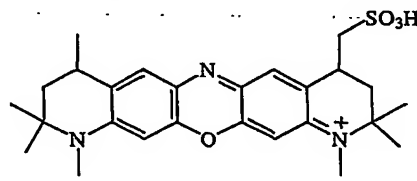
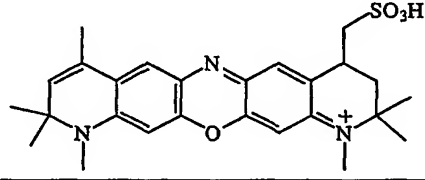
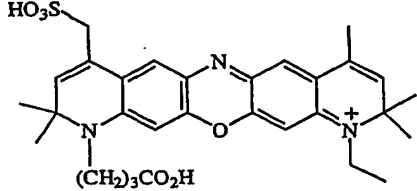
Oxazinfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_a Absorptionsmaximum, λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
42 JA 378		655	680
43 JA 379		675	699
44 JA 322		674	699
45 JA 324-S		673	698
46 JA 326		655	679
47 JA 329		654	678

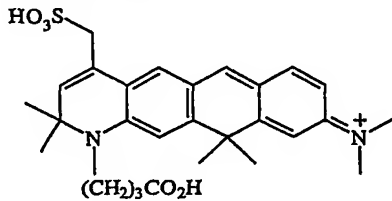
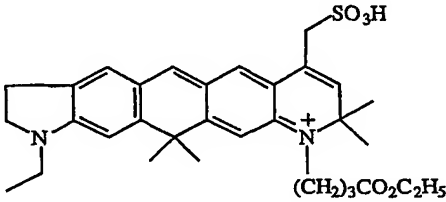
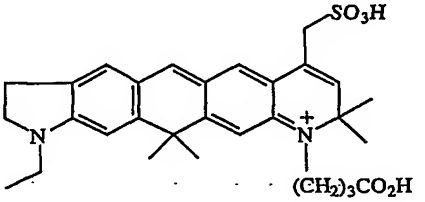
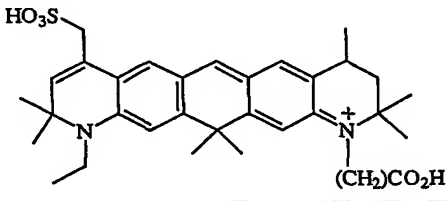
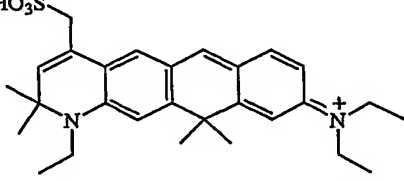
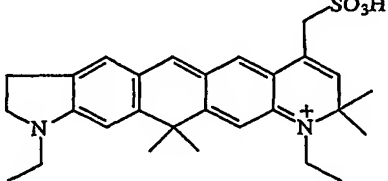
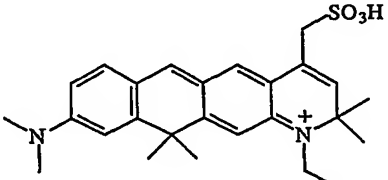
- 22 -

48 JA 410		694	717
49 JA 331		674	695
50 JA 366		654	678
51 JA 403		653	676
52 JA 404		678	699
53 JA 408		694	715

5

Tabelle 2d:**Carbopyroninfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe**Spektrale Daten in Ethanol: λ_a Absorptionsmaximum, λ_f Fluoreszenzmaximum

10

Name	Farbstoff (Anion A')	λ_a / nm	λ_f / nm
54 JA 323		637	664
55 AZ 30		648	675
56 AZ 31		648	674
57 AZ 35		649	674
58 AZ 8-SO ₃ H		641	666
59 AZ 9-SO ₃ H		647	675
60 AZ 10-SO ₃ H		637	664

- 24 -

61 AZ 11- SO ₃ H		664	688
62 AZ 12- SO ₃ H		647	674

Tabelle 2e:

15 **Amidopyryliumfarbstoffe mit Sulfonsäure-Gruppe**

Spektrale Daten in Ethanol: λ_a Absorptionsmaximum,

λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
63 NK 32		635	695
64 NK 34		610	668

20 **Tabelle 3a:**

Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Cumarinfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol: λ_a Absorptionsmaximum,

λ_f Fluoreszenzmaximum

- 25 -

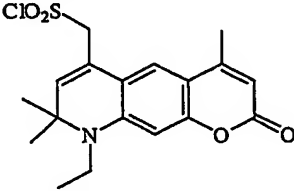
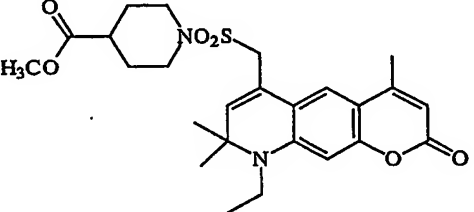
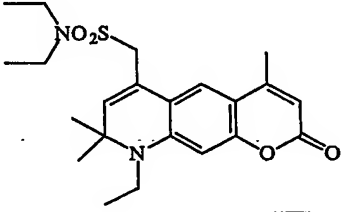
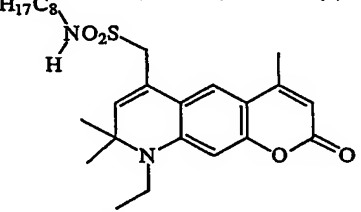
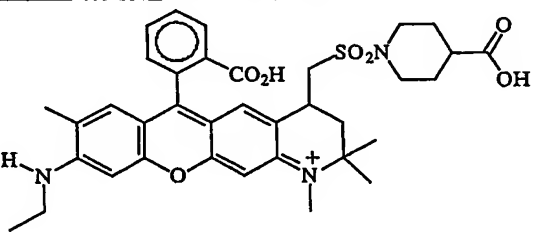
Name	Struktur	λ_a / nm	λ_f / nm
65 AZ 96		394	468
66 AZ 97		393	468
67 AZ 98		394	467
68 AZ 99		393	469

Tabelle 3b:**Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Rhodaminfarbstoffe**

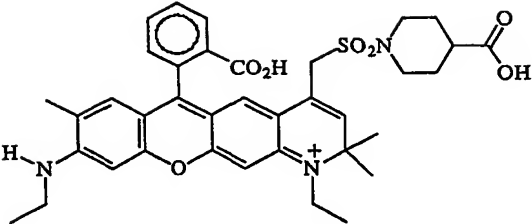
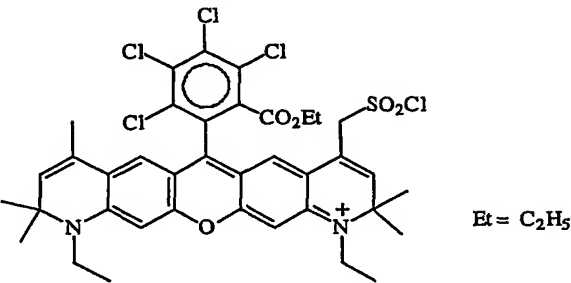
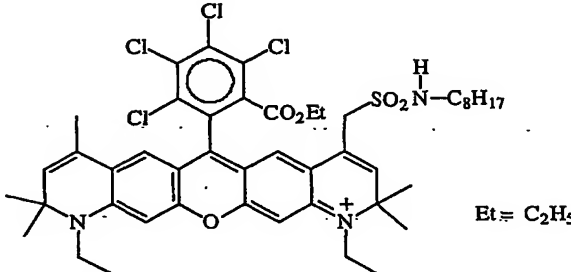
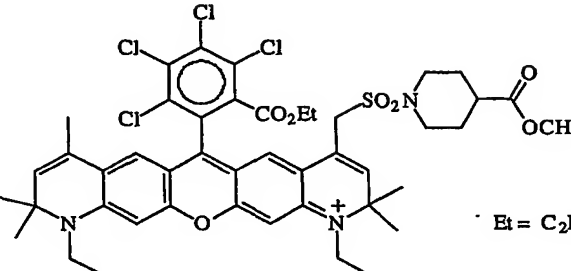
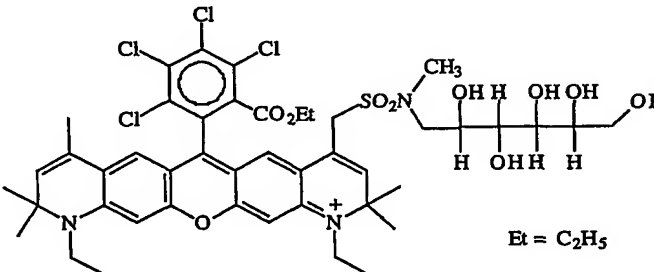
Spektrale Daten in Ethanol:

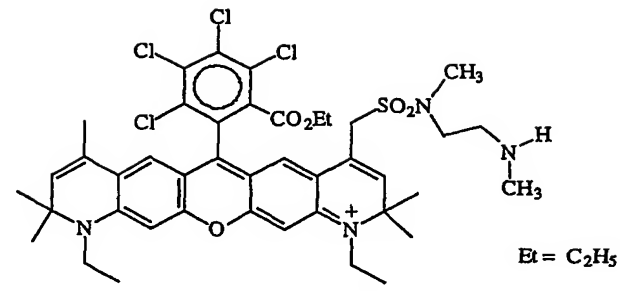
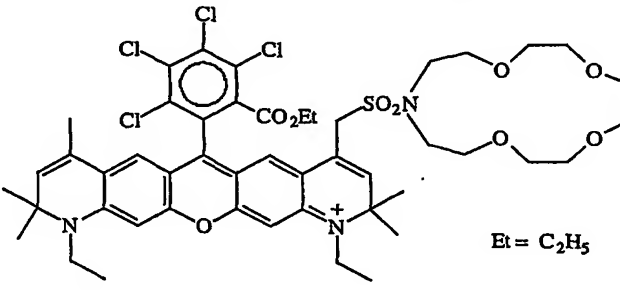
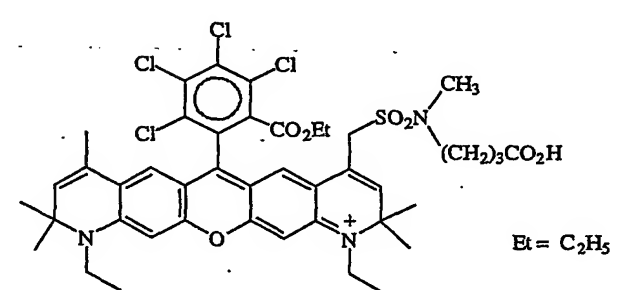
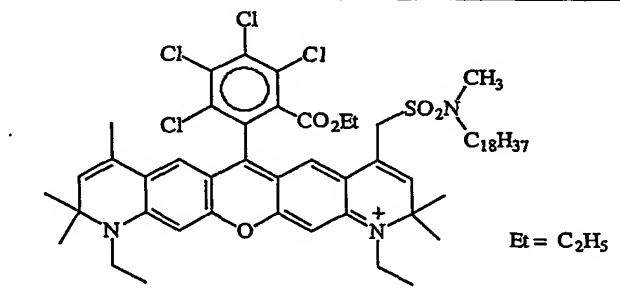
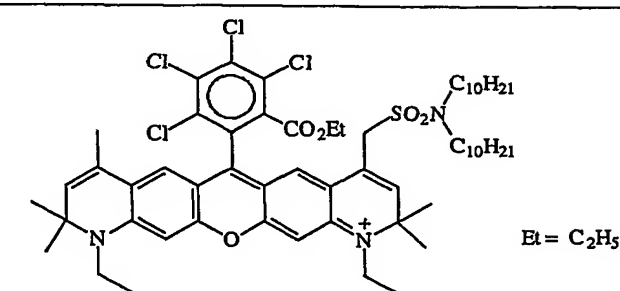
 λ_a Absorptionsmaximum, λ_f Fluoreszenzmaximum

5

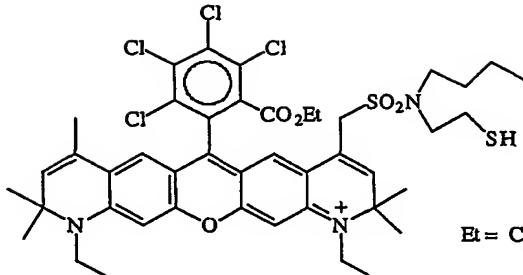
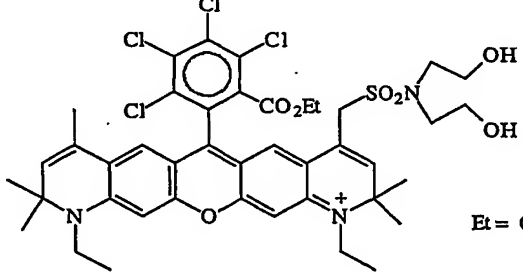
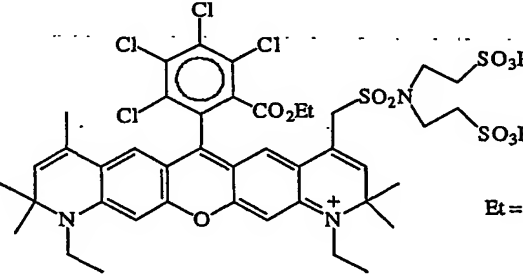
Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
69 AZ 49		542	567

- 26 -

<p>70 AZ 50</p>		561	587
<p>71 AZ 84</p>	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	644
<p>72 AZ 85</p>	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	644
<p>73 AZ 86</p>	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	645
<p>74 AZ 88</p>	 <p>Et = C₂H₅</p>	623	644

75 AZ 89	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	644
76 AZ 90	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	645
77 AZ 87	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	644
78 AZ 93	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	644
79 AZ 94	 <p>Et = C₂H₅</p>	624	646

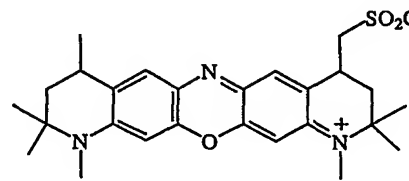
- 28 -

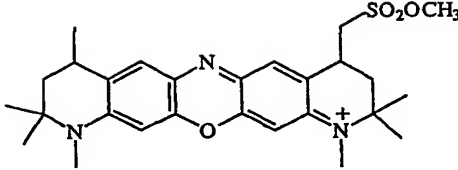
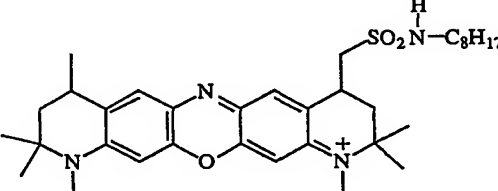
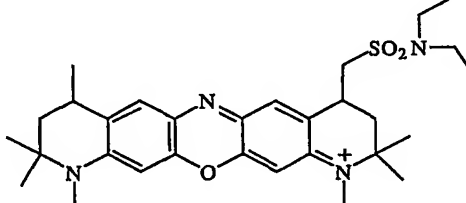
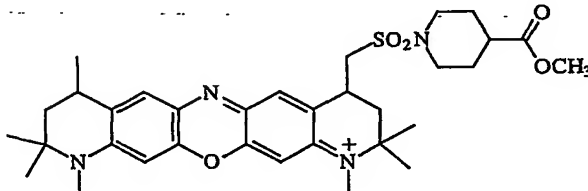
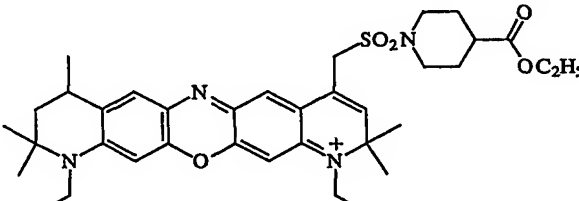
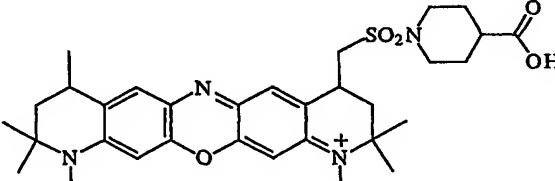
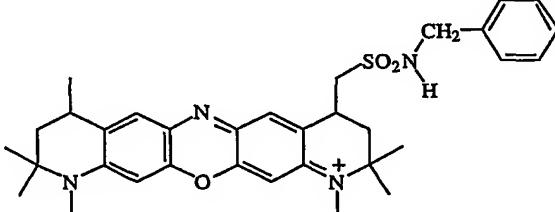
80 AZ 95	 Et = C ₂ H ₅	624	644
81 AZ 91	 Et = C ₂ H ₅	624	646
82 AZ 92	 Et = C ₂ H ₅	624	644

10 **Tabelle 3c:****Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Oxazinfarbstoffe**

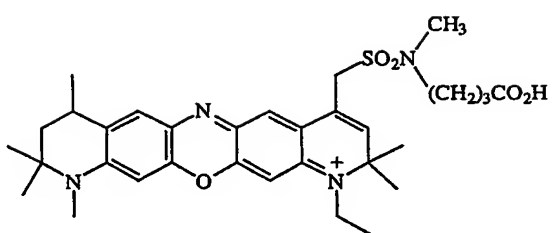
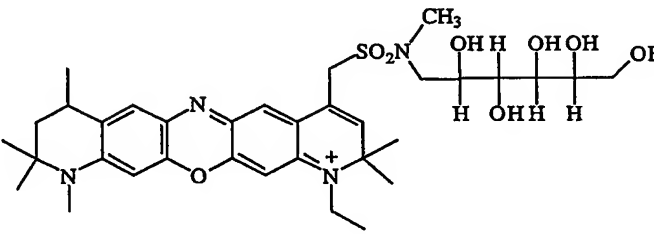
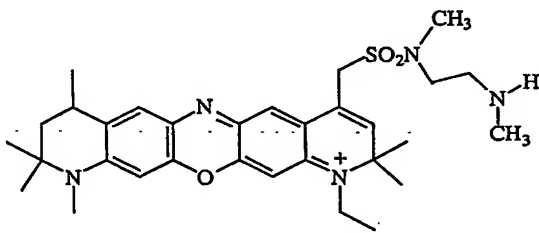
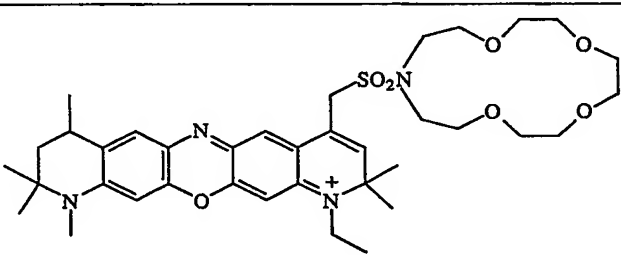
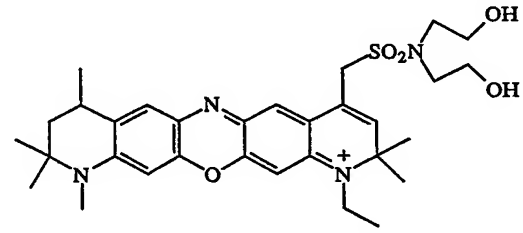
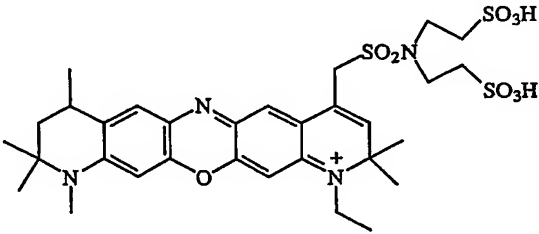
Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_a Absorptionsmaximum, λ_f Fluoreszenzmaximum

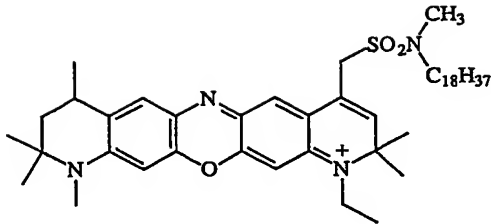
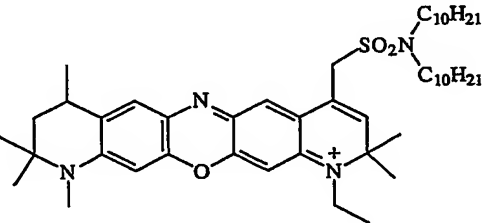
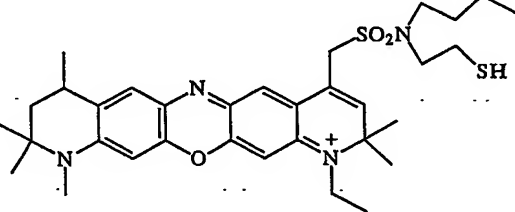
Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
83 AZ 46		654	680

84 JA 403 ME		654	679
85 AZ 54		653	677
86 AZ 55		654	679
87 AZ 56		653	678
88 AZ 52		678	699
89 AZ 57		653	677
90 AZ 102		654	678

- 30 -

91 AZ 73		678	717
92 AZ 74		678	715
93 AZ 75		679	715
94 AZ 76		678	715
95 AZ 77		678	716
96 AZ 78		677	714

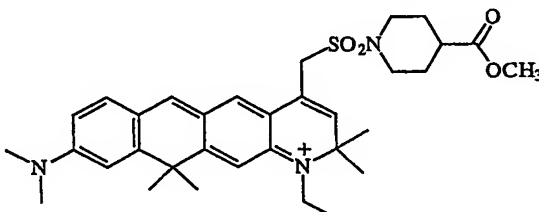
- 31 -

97 AZ 79		678	716
98 AZ 80		678	715
99 AZ 81		679	715

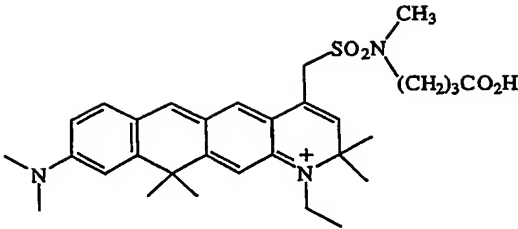
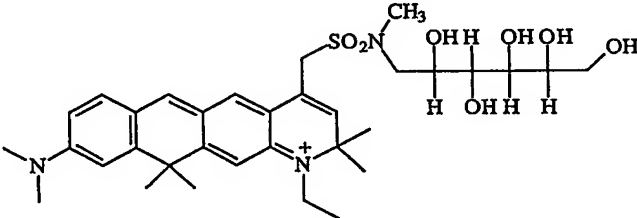
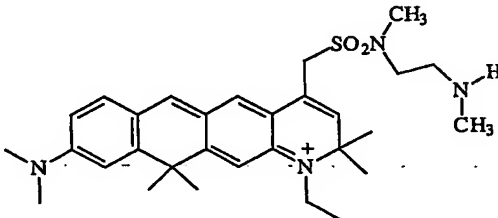
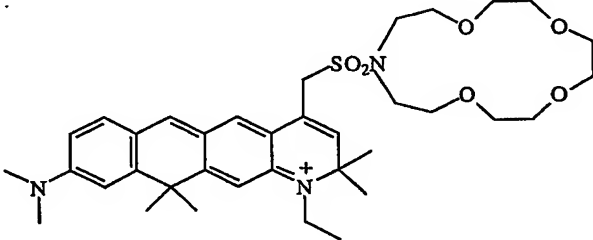
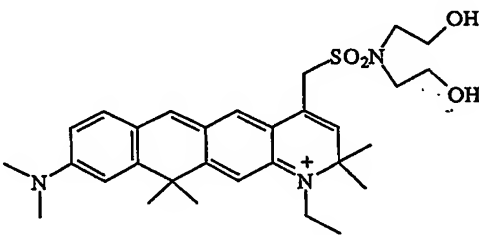
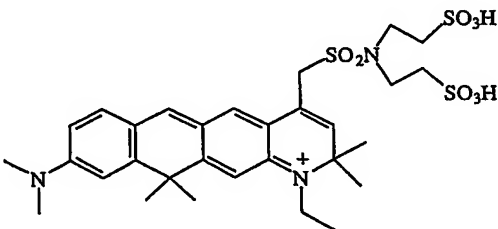
15

Tabelle 3d:**Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Carbopyroninfarbstoffe**

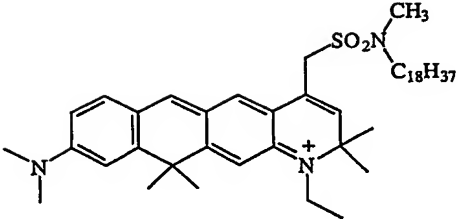
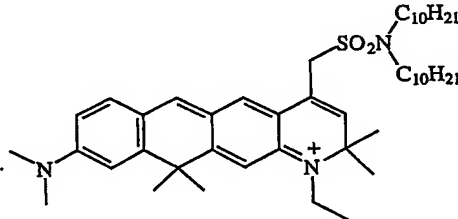
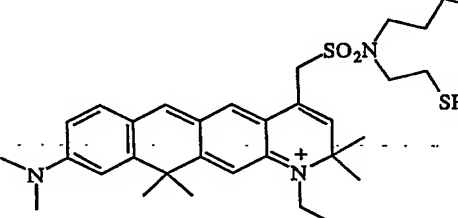
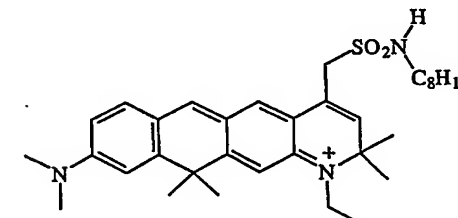
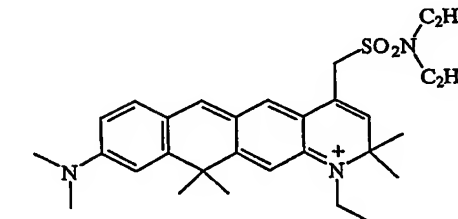
20 Spektrale Daten in Ethanol: λ_a Absorptionsmaximum,
 λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
100 AZ 48		634	658

- 32 -

101 AZ 64		635	661
102 AZ 65		634	661
103 AZ 66		635	663
104 AZ 67		635	663
105 AZ 68		634	662
106 AZ 69		634	661

- 33 -

107 AZ 70		634	662
108 AZ 71		634	662
109 AZ 72		635	661
110 AZ 82		634	661
111 AZ 83		635	663

25 **Tabelle 3e:**
Sulfonsäurederivate erfindungsgemäßer Trifluormethyl-substituierter Xanthenfarbstoffe

Spektrale Daten in Ethanol:

 λ_a Absorptionsmaximum, λ_f Fluoreszenzmaximum

Name	Struktur (Anion A ⁻)	λ_a / nm	λ_f / nm
112 AZ 51		665	694
113 AZ 63		664	694
114 AZ 60		651	680
115 AZ 62		652	680
116 AZ 61		652	679

Beispiele

- 5 Die Erfindung wird durch nachfolgende Beispiele näher erläutert. Es sind sowohl Beispiele für die Herstellung der sulfonierten Chinolinvorstufen und ihre Derivatisierung als auch Beispiele für die Synthese und Modifizierung von Farbstoffen aus den entsprechend sulfonierten Chinolinen angegeben. Die als Ausgangsverbindungen für die unter 1. beschriebenen Verbindungen

- 35 -

verwendeten Dihydro- und Tetrahydrochinoline und primären bzw. sekundären Amine sind entweder kommerziell erhältlich oder nach literaturbekannten Synthesen oder dem Fachmann bekannten Verfahren darzustellen. Dies trifft auch für die Ausgangsfarbstoffe der unter 2.
5 beschriebenen Farbstoffderivate zu.

1. Vorstufen: Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen

Verbindung 8

10

Zur Darstellung von (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (**8**) werden 6,0 g (21 mmol) 1-Ethyl-2,2,4-dimethyl-1,2-dihydrochinolin unter Eiskühlung in einem Gemisch aus 10 ml konzentrierter Schwefelsäure und Oleum im Verhältnis 5:1 gelöst. Es wird 20 Stunden bei
15 Raumtemperatur verrührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis gegossen und mit 20 %iger Natronlauge unter Eis/Methanol-Kühlung alkalisch gestellt (pH12). Zur Entfernung des nicht umgesetzten Edukts wird mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase bis zur Trockene am Rotationsverdampfer eingengt. Der kristalline Rückstand wird in Ethanol suspendiert, vom
20 Natriumsulfat abgesaugt und die organische Phase am Rotationsverdampfer zur Trockene eingengt. Der harzige Rückstand kristallisiert bei Zugabe von Aceton. Es wird erneut abgesaugt, mit Aceton gewaschen und unter Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt kann ohne weitere Reinigungsschritte in der nächsten Stufe eingesetzt werden.

25 Ausbeute 82 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 282$ (MH^+)

NMR (DMSO- d_6): \underline{CH}_3CH_2- , 0.97ppm, T, 3; $-CH_2-N$, 3.39ppm, Q, 2; 2x \underline{CH}_3- , 1.31ppm, S, 6; $=\underline{CH}$, 5.74ppm, S, 1; $-CH_2SO_3H$, 4.27ppm, S, 2; \underline{H} arom., 7.15-7.58ppm, M, 4.

30

Verbindung 9

Zur Darstellung von (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure-chlorid (**9**) werden 2,5 g (8,8 mmol) (1-Ethyl-2,2-dimethyl-
5 1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (**8**) in 70 ml trockenem Benzol suspendiert und bei Raumtemperatur portionsweise mit Phosphorpentachlorid 4,6 g (22,2 mmol) versetzt. Die Reaktionsmischung färbt sich zunächst gelb, später gelborange. Der weiße Niederschlag wird nach 1.5 Stunden abfiltriert und mit kaltem trockenem Benzol gewaschen. Es
10 wird im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Das erhaltene Säurechlorid wird ohne weitere Reinigung sofort in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute 75 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 300$ (MH^+)

15

Verbindung 10

Zur Darstellung von (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (**10**) werden 2 g (6,6
20 mmol) (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäurechlorid (**9**) in 40 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit einem Eisbad gekühlt. Man versetzt tropfenweise mit 1,13 g (7,9 mmol) 4-Piperidincarbonsäuremethylester gefolgt von 0,85 g (6,6 mmol) Diisopropylethylamin. Die Reaktionsmischung wird 30 Minuten bei
25 Raumtemperatur verrührt. Man versetzt mit Wasser und extrahiert mit Chloroform, wäscht mit 10 %iger kalter Sodalösung und trocknet über wasserfreiem Natriumsulfat. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

30 Ausbeute 82 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 407$ (MH^+)

Verbindung 13

Zur Darstellung von 1-(1-Ethyl-6-formyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl-methan-sulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (**13**) werden 3 ml trockenes Dimethylformamid im Eis/Methanol Bad auf -10 °C gekühlt und
5 tropfenweise mit 0,45 ml (4,9 mmol) Phosphoroxidtrichlorid versetzt. Die Reaktionsmischung wird 20 Minuten bei -5 °C verrührt. (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäure-methylester (**10**) werden in 1,5 ml trockenem Dimethylformamid gelöst und bei -5 °C dem
10 Reaktionsgemisch zugetropft. Nach beendeter Zugabe wird 50 Minuten auf 80 °C erhitzt. Die Reaktionslösung wird auf Eiswasser gegossen und mit Chloroform versetzt. Es wird mit 20 %iger Natronlauge auf pH12 eingestellt und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die organische Phase wird mit 10 % iger Sodalösung gewaschen und über wasserfreiem Natriumsulfat
15 getrocknet. Das erhaltene Rohprodukt wird am Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingeeengt und an Kieselgel über einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 88 %.

20 ESI-Massenspektrum: $m/z = 435$ (MH^+)

NMR ($CDCl_3$): \underline{CH}_3CH_2- , 1.22ppm, T, 3; $-\underline{CH}_2-N$, 3.41ppm, Q, 2; 2x \underline{CH}_3- , 1.42ppm, S, 6; $=\underline{CH}$, 5.63ppm, S, 1; $-\underline{CH}_2SO_2N$, 4.00ppm, S, 2; \underline{H} -5 arom., 7.59ppm, S, 1; \underline{H} -7 arom., 7.57ppm, D, 1; \underline{H} -8 arom., 6.55ppm, D, 1; $\underline{H}-C=O$, 9.68ppm, S, 1; $-O-\underline{CH}_3$, 3.63ppm, S, 1; \underline{CH} (Piperidin)- $C=O$, 2.31ppm, M, 1; N- \underline{CHH}' (Piperidin), 2.83ppm u. 3.52ppm; M, 2,2; HC- \underline{CHH}' (Piperidin), 1.67ppm u. 1.83ppm; M, 2,2.

Verbindung 14

Zur Darstellung von 1-(1-Ethyl-6-hydroxymethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (**14**) werden 1 g (2,3 mmol) 1-(1-Ethyl-6-formyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-

- 38 -

yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (**13**) in 10 ml Ethanol gelöst und unter Eiskühlung mit 0,05g Natriumborhydrid versetzt, wobei eine deutliche Gasentwicklung mit Schäumen zu beobachten ist. Es wird 50 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Zur Zersetzung des Überschusses an Reduktionsmittel wird tropfenweise mit 1 N Salzsäure versetzt bis kein Schäumen mehr zu beobachten ist (pH7). Man gießt auf 50 ml Wasser und extrahiert 3 mal mit 20 ml Chloroform. Die vereinigten organischen Phasen werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bis zur Trockene abdestilliert. Der erhaltene Rückstand wird an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 88 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 435$ (MH^+)

NMR ($CDCl_3$): $\underline{CH_3}CH_2-$, 1.10ppm, T, 3; $-CH_2-N$, 3.25ppm, Q, 2; 2x $\underline{CH_3}$, 1.27ppm, S, 6; $=\underline{CH}$, 5.53ppm, S, 1; $-CH_2SO_2N$, 3.96ppm, S, 2; \underline{H} -5 aromaten, 7.10ppm, S, 1; \underline{H} -7 aromaten, 7.05ppm, D, 1; \underline{H} -8 aromaten, 6.46ppm, D, 1; $\underline{H_2}C-OH$, 4.47ppm, S, 1; $-O-\underline{CH_3}$, 3.57ppm, S, 1; \underline{CH} (Piperidin)-C=O, 2.29ppm, M, 1; N- $\underline{CHH'}$ (Piperidin), 2.82ppm u. 3.53ppm; M, 2,2; HC- $\underline{CHH'}$ (Piperidin), 1.68ppm u. 1.73ppm; M, 2,2; $-CH_2-OH$, nn.

Verbindung 3

10

Zur Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (**3**) werden 5,0 g (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure in 100 ml Methanol gelöst und mit 0,5 g 10 %igem Palladium auf Aktivkohle versetzt. Das Reaktionsgemisch wird im Autoklaven 18 Stunden bei 70 bar und Raumtemperatur hydriert. Man filtriert und engt am Rotationsverdampfer zur Trockene ein. Der erhaltene Feststoff lässt sich ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe einsetzen.

15

Ausbeute 90 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 270$ (MH^+)

20

Verbindung 11

Die Darstellung von N,N-Diethyl-(1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-
5 methansulfonamid (**11**) erfolgt analog Verbindung (**10**) unter Verwendung
von Verbindung (**9**) mit Diethylamin. Die säulenchromatographische
Isolierung des Produktes erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach
Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 79 %.

10 ESI-Massenspektrum: $m/z = 337$ (MH^+)

Verbindung 12

Die Darstellung von (1-Ethyl-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-N-octyl-
15 methansulfonamid (**12**) erfolgt analog Verbindung (**10**) unter Verwendung
von Verbindung (**9**) mit n-Octylamin. Die säulenchromatographische
Isolierung des Produktes erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach
Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 81 %

20 ESI-Massenspektrum: $m/z = 393$ (MH^+)

Verbindung 15

Zur Darstellung von (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-
25 methansulfonsäure (**15**) werden 20 g (8,6 mmol) 1-Ethyl-7-methoxy-2,2,4-
dimethyl-1,2-dihydrochinolin unter Eiskühlung in einem Gemisch aus 10 ml
konzentrierter Schwefelsäure und Oleum im Verhältnis 5:1 gelöst. Es wird 20
Stunden bei Raumtemperatur verrührt. Das Reaktionsgemisch wird auf Eis
gegossen und mit 20 %iger Natronlauge unter Eis/Methanol Kühlung
30 alkalisch gestellt (pH12). Zur Entfernung des nicht umgesetzten Edukts wird
mit Chloroform extrahiert und die wässrige Phase zur Trockene am
Rotationsverdampfer eingeengt. Der kristalline Rückstand wird

- 40 -

säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten gereinigt.

Ausbeute 86 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 312$ (MH^+)

- 5 NMR ($DMSO-d_6$): \underline{CH}_3CH_2- , 1.09ppm, T, 3; $-\underline{CH}_2-N$, 3.25ppm, Q, 2; 2x \underline{CH}_3- , 1.24ppm, S, 6; $=\underline{CH}$, 5.28ppm, S, 1; $-\underline{CH}_2SO_3H$, 3.43ppm, S, 2; \underline{H} -5 arom., 6.04ppm, D, 1; \underline{H} -6 arom., 7.17ppm, D, 1; \underline{H} -8 arom., 5.93ppm, S, 1; CH_3O- , 3.68ppm, S, 3.

Verbindung 16

Die Darstellung von (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methan-sulfonsäurechlorid (**16**) erfolgt analog Verbindung (**9**) aus Verbindung (**15**) und Phosphorpentachlorid in trockenem Benzol. Das erhaltene Säurechlorid wird sofort zur weiteren Umsetzung eingesetzt.

Ausbeute 73 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 330$ (MH^+)

Verbindung 17

- 10 Die Darstellung von (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester (**17**) erfolgt analog Verbindung (**10**) aus Verbindung (**16**) in trockenem Acetonitril bei Raumtemperatur.

Ausbeute 69 %.

- 15 ESI-Massenspektrum: $m/z = 437$ (MH^+)

- NMR ($CDCl_3$): \underline{CH}_3CH_2- , 1.15ppm, T, 3; $-\underline{CH}_2-N$, 3.27ppm, Q, 2; 2x \underline{CH}_3- , 1.31ppm, S, 6; $=\underline{CH}$, 5.41ppm, S, 1; $-\underline{CH}_2SO_2N$, 3.97ppm, S, 2; \underline{H} -5 arom., 6.17ppm, D, 1; \underline{H} -6 arom., 7.07ppm, D, 1; \underline{H} -8 arom., 6.09ppm, S, 1; $-O-\underline{CH}_3$, 3.77ppm, S, 1; \underline{CH} (Piperidin)- $C=O$, 2.31ppm, M, 1; $N-\underline{CHH}'$ (Piperidin), 2.82ppm u. 3.63ppm; M, 2,2; $HC-\underline{CHH}'$ (Piperidin), 1.63ppm u. 1.80ppm; M, 2,2; $O=C-O\underline{CH}_3$, 3.63, S, 3.
- 20

Verbindung 18

Zur Darstellung von (1-Ethyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methan-sulfonsäure (**18**) werden 5 g (16,1 mmol) (1-Ethyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydrochinol-4-yl)-methansulfonsäure (**16**) in 10 ml 48 %iger
5 Bromwasserstoffsäure suspendiert und 2 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Man gießt auf Eis, versetzt mit Chloroform und neutralisiert mit 20 %iger Natronlauge. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige Phase am Rotationsverdampfer im Vakuum zur Trockene einrotiert. Der Rückstand
10 Trockene einrotiert. Das so erhaltene Produkt wird ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe eingesetzt.

Ausbeute 91 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 298$ (MH^+)

15 Verbindung 19

Die Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl)-methansulfonsäurechlorid (**19**) erfolgt analog
Verbindung (**16**) unter Verwendung von Verbindung (**3**) und
20 Phosphorpentachlorid mit dem Unterschied, dass 18 Stunden bei Raumtemperatur verrührt wird.

Ausbeute 78 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 317$ (MH^+)

25 Verbindung 20

Die Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl-methansulfonyl)-piperidin-4-carbonsäuremethylester
(**20**) erfolgt analog Verbindung (**10**) aus Verbindung (**19**) mit 4-Piperidincarbonsäuremethylester in trockenem Acetonitril. Die

- 42 -

säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 69 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 425$ (MH^+)

5

Verbindung 21

Die Darstellung von (1-Methyl-7-methoxy-2,2-dimethyl-1,2,3,4-tetrahydrochinol-4-yl)-N-octyl-methansulfonamid (21) erfolgt analog Verbindung (10) aus Verbindung (19) mit n-Octylamin in trockenem Acetonitril. Die säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

10

Ausbeute 69 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 411$ (MH^+)

15 2. Farbstoffe: Herstellung erfindungsgemäßer Verbindungen

Verbindung 55 (AZ 30)

1,2 g (4,93 mmol) 4-(6-Hydroxymethyl-2,2,4-trimethyl-2H-chinol-1-yl)-buttersäure-ethylester werden zusammen mit 0,72 g (4,93 mmol) 1-Ethyl-6-isopropenyl-indolin in 20 ml trockenem Dichlormethan gelöst und auf -5 °C gekühlt. Man versetzt tropfenweise mit 7 ml einer 1 molaren Lösung von Bortrichlorid in Dichlormethan. Das Reaktionsgemisch wird 2 Stunden bei Raumtemperatur verrührt, das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand in konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Die Reaktionsmischung wird 4 Stunden bei Raumtemperatur verrührt. Man tropft in eiskaltes Ethanol, versetzt mit 0,8 g Tetrabutylammoniummetaperiodat und erhitzt kurz zum Sieden. Man lässt abkühlen, versetzt mit Wasser und nimmt den Farbstoff in Chloroform auf. Es wird über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und die Farbstofflösung am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Das erhaltene Farbstoffrohprodukt wird an Kieselgel mit einem

25

30

- 43 -

von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 45 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 565$ (M^+)

5 Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 648$ nm (in Ethanol)

Verbindung 83 (AZ 46)

100 mg (0,21 mmol) JA 403 werden in 8 ml trockenem Acetonitril gelöst und
10 im kalten Wasserbad gekühlt. Man versetzt mit 4 Tropfen trockenem Dimethylformamid gefolgt von 6 Tropfen frisch destilliertem Thionylchlorid. Es wird 45 Minuten verrührt. Die Umsetzung erfolgt quantitativ. Das Reaktionsgemisch wird in einem Eisbad gekühlt. Die Farbstofflösung wird in eine mit Eis/Methanol gekühlte 20 %ige Natriumperchloratlösung getropft.
15 Der sich in feinen Kristallen abscheidende Farbstoff wird abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und im Ölpumpenvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet. Der Farbstoff kann ohne zusätzliche Reinigung für weitere Umsetzungen eingesetzt werden.

Ausbeute 81 %.

20 ESI-Massenspektrum: $m/z = 502$ (M^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 650$ nm (Acetonitril)

Verbindung 90 (AZ 102)

25 10 mg (0.017 mmol) AZ 46 werden in 5 ml trockenem Acetonitril gelöst und mit 5 ml einer 10 mmolaren Lösung aus Benzylamin in trockenem Acetonitril versetzt. Das Reaktionsgemisch wird 20 Minuten bei Raumtemperatur verrührt. Die Reaktionslösung wird zur Trockene einrotiert und an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten
30 säulenchromatographisch gereinigt.

Ausbeute 88 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 573$ (M^+)

- 44 -

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 653$ nm (in Ethanol)

Verbindung 87 (AZ 56)

- 5 Die Synthese erfolgt analog zur Darstellung von AZ 102 unter Verwendung einer 10 mmolaren Lösung von 4-Piperidincarbonsäuremethylester. Die Isolierung erfolgt säulenchromatographisch an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 91 %.

- 10 ESI-Massenspektrum: $m/z = 609$ (M^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 652$ (in Ethanol)

Verbindung 89 (AZ 57)

- 15 10 mg (0,014 mmol) AZ 56 werden in 20 ml Acetonitril Wasser 1:1 gelöst und mit 0,5 ml 2 N Salzsäure versetzt. Die Reaktionsmischung wird 7 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Farbstofflösung wird unter Vakuum eingeeengt und an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

- 20 Ausbeute 62 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 595$ (M^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 652$ nm (in Ethanol)

Verbindung 34 (AZ 59)

25

- 500 mg (1,7 mmol) (1-Ethyl-7-hydroxy-2,2-dimethyl-1,2-dihydroChinol-4-yl)-methan-sulfonsäure (18), 440 mg (3,4 mmol) Acetessigsäureethylester und 460 mg trockenes Zinkchlorid werden in 40 ml absolutem Ethanol suspendiert und 24 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die Reaktionsmischung
30 wird filtriert, am Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und der Rückstand an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

- 45 -

Ausbeute 60 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 364$ (MH^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 394$ nm (in Ethanol)

5 **Verbindung 71 (AZ 84)**

Die Synthese erfolgt analog AZ 46 unter Verwendung von JA 407-E mit Thionylchlorid/DMF in trockenem Acetonitril. Der erhaltene Farbstoff wird als Perchlorat isoliert und getrocknet. Das Farbstoffsulfochlorid kann ohne
10 weitere Reinigung sofort weiter umgesetzt werden.

Ausbeute 81 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 811$ (M^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 623$ nm (in Ethanol)

15 **Verbindung 72 (AZ 85)**

Die Darstellung erfolgt analog AZ 102 unter Verwendung von AZ 84 und n-Octylamin in trockenem Acetonitril. Die säulenchromatographische Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden
20 Gradienten.

Ausbeute 73 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 904$ (M^+)

Verbindung 65 (AZ 96)

25

Die Darstellung erfolgt analog Verbindung (9) aus AZ 59 mit Phosphorpentachlorid in Benzol wobei 6 Stunden bei Raumtemperatur verrührt wird.

Ausbeute 63 %.

30 ESI-Massenspektrum: $m/z = 383.2$ (MH^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 392$ nm (in Ethanol)

Verbindung 66 (AZ 97)

Die Darstellung erfolgt analog AZ 102 aus AZ 96 mit 4-Piperidincarbonsäuresäureethylester. Die säulenchromatographische
5 Isolierung erfolgt an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten.

Ausbeute 76 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 489.2$ (MH^+)

Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 393$ nm (in Ethanol)

10

Verbindung 84 (JA 403 ME)

100 mg (0,17 mmol) JA 403 werden mit 0,5 ml Dimethylsulfat in 20 ml trockenem Acetonitril gelöst und für ca. 5 Stunden zum Rückfluss erhitzt. Die
15 Reaktion wird dünnschicht-chromatographisch verfolgt. Nach Beendigung der Umsetzung wird die Reaktionsmischung zur Trockne eingeeengt, in wenig Chloroform aufgenommen und der Rückstand an Kieselgel mit einem von Chloroform nach Ethanol verlaufenden Gradienten säulenchromatographisch gereinigt.

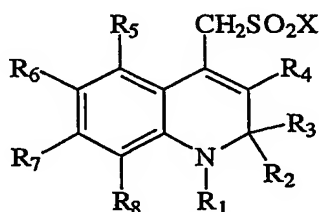
20 Ausbeute 70 %.

ESI-Massenspektrum: $m/z = 498$ (M^+)

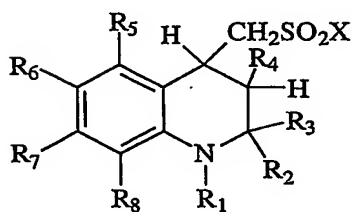
Absorptionsmaximum: $\lambda_a = 654$ nm (in Ethanol)

Ansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Dihydrochinolinverbindungen der allgemeinen Formel Ia oder von Tetrahydrochinolinverbindungen der allgemeinen Formel Ib



Ia

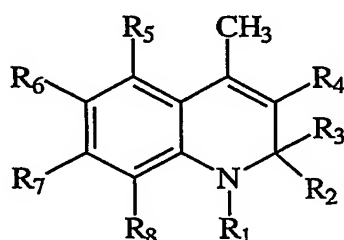


Ib

- 10 worin R₁ Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,
- 15 R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ und R₈ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R₁ und R₈
- 20 zusammen ein Ringsystem bilden und
- X OH, Halogen, -O-R₉, -S-R₁₀ oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁

und R_{12} unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann.

5 **dadurch gekennzeichnet,**
dass man die entsprechenden Verbindungen I'a



l'a

zu Ia (X = OH) sulfoniert und gegebenenfalls durch Hydrierung zu Ib (X = OH) umgesetzt.

2. Verfahren nach Anspruch 1,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die Sulfonierung mittels konzentrierter Schwefelsäure durchführt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die bei der Sulfonierung gebildete Sulfonsäuregruppe derivatisiert.

4. Verfahren nach Anspruch 3,

dadurch gekennzeichnet,

dass man die Sulfonsäuregruppe zum Sulfochlorid umsetzt.

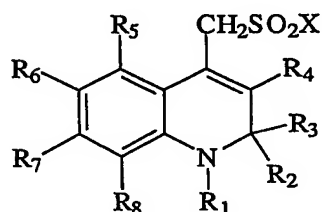
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4,

dadurch gekennzeichnet,

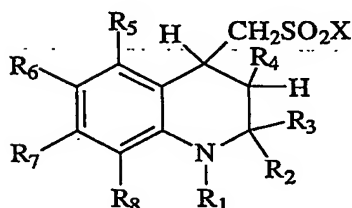
- 49 -

dass man die Sulfochloridgruppe mit einem primären oder sekundären Amin zum Sulfonamid umsetzt.

6. Dihydrochinolinverbindung der allgemeinen Formel Ia oder
5 Tetrahydrochinolinverbindung der allgemeinen Formel Ib



Ia



Ib

10 worin R₁ Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,

15 R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇ und R₈ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R₁ und R₈ zusammen ein Ringsystem bilden und

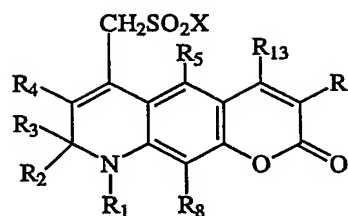
20 X OH, Halogen, -O-R₉, -S-R₁₀ oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder

- 50 -

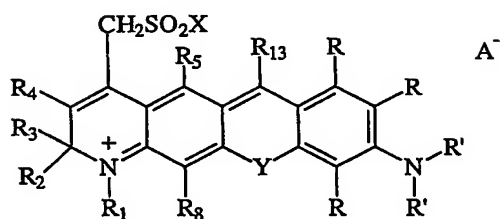
mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten, insbesondere -SO₃H, -PO₃H₂ und -COOH enthalten kann.

7. Verbindung nach Anspruch 6,
5 worin R₁ einen Aryl- oder Alkylrest, insbesondere einen C5 bis C15-Aryl- oder einen C1 bis C20-Alkylrest darstellt, R₂ und R₃ Methyl sind und R₄ Wasserstoff bedeutet.
8. Verbindung nach Anspruch 6 oder 7,
10 **dadurch gekennzeichnet,**
 dass R₇ einen Hydroxy- oder Methoxyrest darstellt.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 8,
 dadurch gekennzeichnet,
15 dass R₆ eine Nitrosogruppe darstellt.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 6 bis 7,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass R₆ eine Formyl- oder eine Hydroxymethylgruppe darstellt.
20
11. Verbindung nach einem der Ansprüche 6 bis 10,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass X Halogen, insbesondere Cl bedeutet.
- 25 12. Verbindung nach einem der Ansprüche 6 bis 11,
 dadurch gekennzeichnet,
 dass X den Rest -NR₁₁R₁₂ darstellt, wobei die Reste R₁₁ und R₁₂ wie in Anspruch 6 definiert sind.
- 30 13. Verfahren zur Herstellung von -SO₂X enthaltenden Farbstoffen der allgemeinen Formeln II bis VII

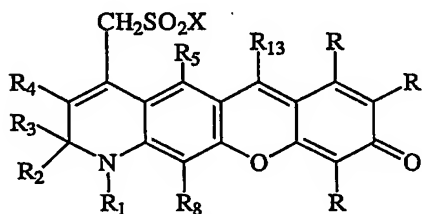
- 51 -



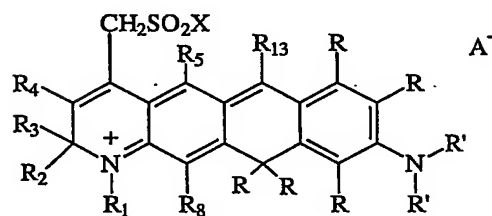
II



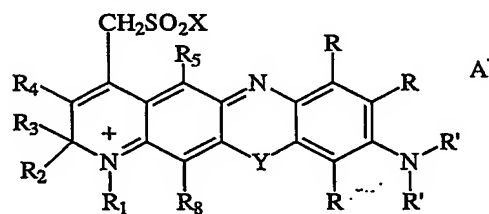
III



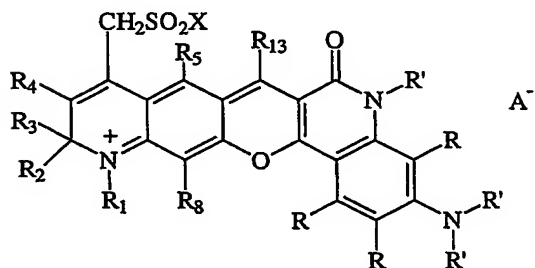
IV



V



VI



VII

worin R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_8 wie in Ansprüchen 1 bis 12 definiert sind, R bei jedem Auftreten gleich oder verschieden sein kann und wie R_1 , R_2 , R_3 , R_4 , R_5 und R_8 definiert ist und R' bei jedem Auftreten unabhängig

- 52 -

voneinander Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R und R' zusammen ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Doppelbindungen enthalten kann,

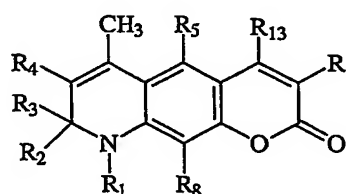
R₁₃ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, wobei R₁₃ insbesondere Wasserstoff, Aryl, Carboxyphenyl, Alkyl, Perfluoralkyl, Cycloalkyl, Pyridyl oder Carboxypyridyl darstellt,

X OH, Halogen, -O-R₉, -S-R₁₀ oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, und

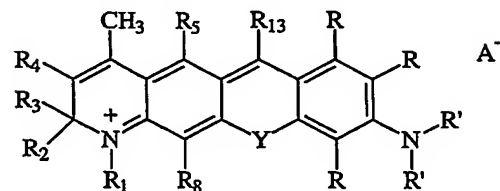
Y in Formel III O, S oder Se sowie Y in Formel VI O, S oder C(R)₂ bedeutet

dadurch gekennzeichnet,

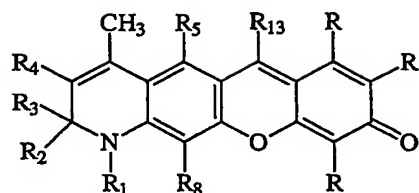
dass man entsprechende Verbindungen der Formeln II' bis VII'



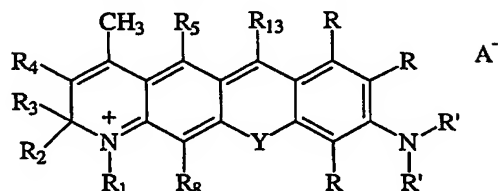
II'



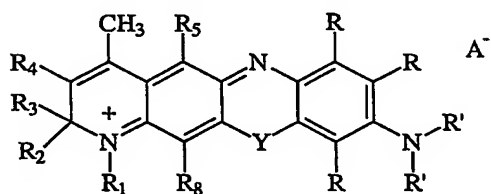
III'



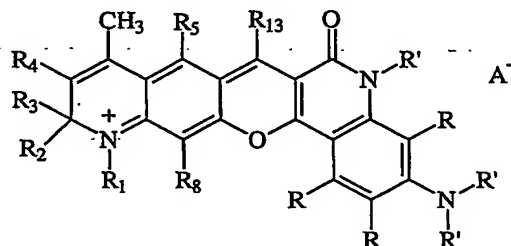
IV'



V'



VI'



VII'

25 sulfoniert, mit der Maßgabe, dass für Verbindungen der Formel III mit Y = O und Verbindungen der Formel IV X nicht OH bedeutet.

14. Verwendung einer Verbindung nach einem der Ansprüche 6 bis 12 oder
erhältlich gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5 zur
Herstellung von polycyclischen Farbstoffen.

30

15. Verwendung nach Anspruch 14 zur Herstellung von polycyclischen
Farbstoffen der Formeln II bis VII.

16. Verfahren zur Herstellung polycyclischer Farbstoffe,
dadurch gekennzeichnet,

35

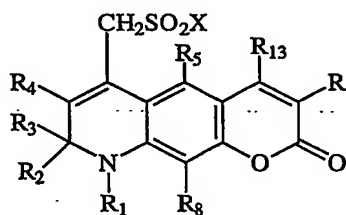
- 54 -

dass man Verbindungen, welche eine Dihydrochinolinendgruppe mit einer 4-Methylgruppe aufweisen, sulfoniert, – gegebenenfalls zum Tetrahydrochinolin hydriert – mit der Maßgabe, dass der polycyclische Farbstoff keine Verbindung der Formel III mit Y = O und X = OH oder der Formel IV mit X = OH ist.

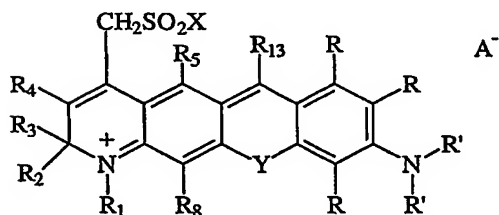
5

17. Polycyclischer Farbstoff erhältlich gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 13 bis 16.

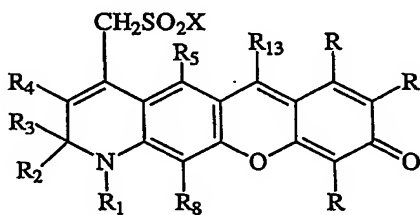
10 18. Polycyclischer Farbstoff der allgemeinen Formel II bis VII



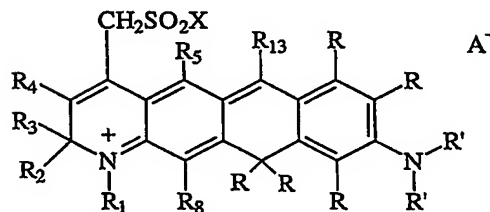
II



III

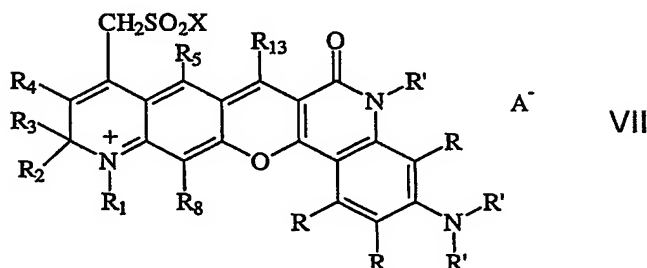
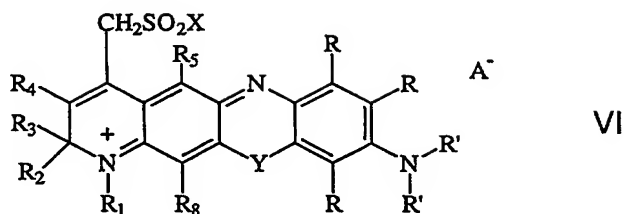


IV



V

- 55 -



worin

15 R' Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann,

R bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff, Halogen, eine Hydroxy-, Amino-, Sulfo-, Carboxy- oder Aldehydgruppe oder eine
20 Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, oder die Reste R' und R zusammen ein Ringsystem bilden, das eine oder mehrere Mehrfachbindungen enthalten kann,

25 R₁₃ bei jedem Auftreten unabhängig voneinander Wasserstoff oder eine Kohlenwasserstoffgruppe mit 1-20 C-Atomen bedeutet, wobei die Kohlenwasserstoffgruppe gegebenenfalls ein oder mehrere Heteroatome oder/und einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, wobei R₁₃ insbesondere Wasserstoff, Aryl, Carboxyphenyl, Alkyl, Perfluoralkyl, Cycloalkyl, Pyridyl oder Carboxypyridyl darstellt,

30 X OH, Halogen, -O-R₉, -S-R₁₀ oder -NR₁₁R₁₂ bedeutet, wobei R₉, R₁₀, R₁₁ und R₁₂ jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen C1 bis C20 Kohlenwasserstoffrest bedeuten, welcher gegebenenfalls ein oder

- 56 -

mehrere Heteroatome oder einen oder mehrere Substituenten enthalten kann, und

Y in Formel III O, S, oder Se sowie Y in Formel VI O, S oder C(R)₂ darstellt,

5 mit der Maßgabe, dass der Farbstoff keine Verbindung der allgemeinen Formel III mit Y = O und X = OH oder der allgemeinen Formel IV mit X = OH ist.

19. Polycyclischer Farbstoff nach Anspruch 17 oder 18,

10 **dadurch gekennzeichnet,**

dass X Halogen, insbesondere Cl, bedeutet.

20. Polycyclischer Farbstoff nach Anspruch 17 oder 18,

dadurch gekennzeichnet,

15 dass X für den Rest -NR₁₁R₁₂ steht, wobei die Reste R₁₁ und R₁₂ wie in Anspruch 18 definiert sind.

21. Polycyclischer Farbstoff nach Anspruch 20,

dadurch gekennzeichnet,

20 dass R₁₁ oder/und R₁₂ einen mit -COOH substituierten Alkyl- oder Arylrest darstellt.

22. Verwendung eines Farbstoffs nach einem der Ansprüche 17 bis 21 zur Markierung eines Analyten.

25

23. Verwendung nach Anspruch 22,

dadurch gekennzeichnet,

dass es sich bei dem Analyten um ein Biomolekül, insbesondere um ein Peptid oder ein Nukleotid, handelt.

30

24. Verwendung nach Anspruch 22 oder 23,

dadurch gekennzeichnet,

- 57 -

dass die Markierung durch Bindung des Farbstoffs an eine NH₂- oder SH-Gruppe des Analyten erfolgt.

25. Verwendung eines Farbstoffs nach Anspruch 19 zur Markierung eines
5 Analyten, wobei die Bindung des Farbstoffs durch Kopplung an eine Aminogruppe des Analyten erfolgt.

26. Verwendung eines Farbstoffs nach Anspruch 21 zur Markierung eines
Analyten, wobei die Bindung des – z.B. als NHS-Ester aktivierten –
10 Farbstoffs durch Kopplung an eine Aminogruppe des Analyten erfolgt.

27. Verwendung eines Farbstoffes nach einem der Ansprüche 17 bis 21 zur
Kopplung an einen weiteren Farbstoff.

15 28. Verwendung nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Kopplung über eine Aminogruppe des weiteren Farbstoffs erfolgt
und dadurch ein FRET-Pärchen gebildet wird.